

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 485–488

Enzymdiagnostik in lipämischen Seren vor und nach Polyanionenpräzipitation mit Heparin und Magnesiumchlorid

Von J. Freise, P. Magerstedt und Ellen Schmidt

Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie (Leiter: Prof. Dr. med. F. W. Schmidt) im Department für Innere Medizin der Medizinischen Hochschule Hannover

(Eingegangen am 28. Dezember 1976/6. April 1977)

Zusammenfassung: Es wird kritisch zu der Methode der Enzymaktivitätsbestimmung in trüben, lipämischen Seren nach Polyanionenpräzipitation mit Heparin und Magnesiumchlorid Stellung genommen. Es zeigt sich, daß gerade bei der Beurteilung von Leber- und Pankreaserkrankungen, die häufig mit Hyperlipoproteinaemien verbunden sind, die Polyanionenpräzipitation nur noch zu Restaktivitäten im geklärten Serum führt. Bei der Glutamatdehydrogenase und der α -Amylase im Phadebatest kommt es durch Heparin und Magnesiumchlorid zu einer Inaktivierung der Enzyme, während bei der γ -Glutamyltransferase die erniedrigte Enzymaktivität im geklärten Serum dadurch verursacht wird, daß die γ -Glutamyltransferase mit den Lipoproteinen, am ehesten mit Chylomikronen, durch die Polyanionenpräzipitation in den *lipidreichen* Überstand überführt wird.

Auch die saure Phosphatase zeigt im geklärten Serum nur noch Restaktivitäten.

Die Aktivität von Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, alkalischer Phosphatase, Leucinarylamidase, Cholinesterase, Creatinkinase, Lactatdehydrogenase und α -Hydroxybutyratdehydrogenase und die α -Amylase im Merckotest bleibt durch die Polyanionenpräzipitation unbeeinflusst.

Enzyme diagnosis in lipaemic sera before and after polyanion precipitation with heparin and magnesium chloride

Summary: The method for the determination of enzymic activity in turbid, lipaemic sera, which involves clearing by polyanion precipitation with heparin and magnesium chloride, was critically reviewed. In the diagnosis of diseases of the liver and pancreas, which are frequently associated with hyperlipoproteinaemia, only residual enzyme activities are measured in the cleared serum after polyanion treatment. In the measurement of glutamate dehydrogenase and in the Phadebas test for α -amylase, the enzymes are inactivated by treatment with heparin and magnesium chloride. On the other hand, as a result of polyanion precipitation γ -glutamyl transferase is transferred, together with lipoproteins and chylomicrons, to the lipid-rich supernatant. Acid phosphatase also exhibits only residual activity in cleared serum. The activity of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, leucine arylamidase, cholinesterase, creatine kinase, lactate dehydrogenase, and α -hydroxybutyrate dehydrogenase, and the activity of α -amylase in the Merckotest are not affected by polyanion treatment of the serum.

Einleitung

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten kann, wie alle photometrischen Messungen in trüben, d.h. vor allem in lipämischen Seren erheblich gestört sein. Es ist daher üblich (1), durch Polyanionenpräzipitation mit Heparin und Magnesiumchlorid die triglyceridreichen Lipoproteine, die die Trübung von Seren meist verursachen, zu fällen und sie durch Zentrifugation in einen lipidreichen Überstand zu überführen, der verworfen wird.

In so „geklärten“ Seren lassen sich Bestimmungen von Enzymaktivitäten ohne Schwierigkeiten durchführen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lambrecht & Seidel (1) machten wir die Erfahrung, daß bei der γ -Glutamyltransferase die Aktivität im geklärten Serum niedriger ist als im trüben lipämischen Serum. Wir haben in zwei früheren Publikationen (2, 3) an Einzelfällen

zeigen können, daß die γ -Glutamyltransferase sich an Chylomikronen anlagert und bei der Präzipitation mit Heparin und Magnesiumchlorid mit diesen in den lipidreichen Überstand übergeführt wird.

Bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten in mit Heparin und Magnesiumchlorid „geklärten“ Seren geht man von der Annahme aus, daß sich die Enzymaktivität durch die Polyanionenpräzipitation nicht ändert, und daß sich vor allem kein Enzym im lipämischen Überstand anreichert. Diese Annahme hat sich jedoch für die γ -Glutamyltransferase als falsch erwiesen (2, 3).

Es galt nun zu untersuchen, ob das Verhalten der γ -Glutamyltransferase bei der Polyanionenpräzipitation eine Ausnahme darstellt, oder ob auch andere der im Routinegebrauch bestimmten Enzymaktivitäten niedrige Werte nach der Präzipitation der Lipoproteine ergeben als im lipämischen Serum. Für unsere Untersuchungen haben wir lipämische Seren verwandt, die zwar sehr trübe waren, aber nicht so milchig, daß eine Enzymbestimmung im nativen Serum nicht möglich war.

Wir haben in klaren und trüben Seren vor und nach Zugabe von Heparin und Magnesiumchlorid neben dem Cholesterin- und Triglyceridgehalt folgende Enzymaktivitäten bestimmt:

Aspartataminotransferase (EC 2.6.1.1)
Alaninaminotransferase (EC 2.6.1.2)
Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3)
Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1)
Leucinarylamidase (EC 3.4.11)
 γ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.2)
Cholinesterase (EC 3.1.1.8)
Creatinkinase (EC 2.7.3.2)
Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27)
 α -Hydroxybutyratdehydrogenase
 α -Amylase (EC 3.2.1.1)
saure Phosphatase (EC 3.1.3.2)

Material und Methoden

Heparin-Magnesiumchloridlösung:

Heparinlösung: Thrombophob ad inj. 5000 IE/ml Heparin-Natrium (Fa. NORDMARK Werke)

Magnesiumlösung: 2 mol/l $MgCl_2$ p.a. (Fa. MERCK, Nr. 5833)

Präzipitationstechnik:

9 Teilen Serum wurde 1 Teil einer Mischung von gleichen Volumina Heparinlösung und $MgCl_2$ -Lösung zugesetzt. Nach Mischen und 30 minütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 10 000 g zentrifugiert. Das lipidreiche Präzipitat an der Oberfläche wurde mit EPPENDORF-Pipetten abgehoben. Im trüben und geklärten Serum wurden dann die Enzymaktivitäten parallel bestimmt.

Enzymbestimmungen

Aspartataminotransferase:

Optimierter Monotest der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124362

Alaninaminotransferase:

Optimierter Monotest der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124976

Glutamatdehydrogenase:

Optimierter, aktivierter Monotest der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124311

Creatinkinase:

Aktivierter Monotest der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124150

Lactatdehydrogenase:

Testkombination der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124893

α -Hydroxybutyratdehydrogenase:

Testkombination der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124818

Saure Phosphatase:

Testkombination der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 125008

Alkalische Phosphatase:

Merckotest, Fa. MERCK, Darmstadt, Nr. 3314

Leucinarylamidase:

Merckotest, Fa. MERCK, Darmstadt, Nr. 3359

γ -Glutamyltransferase:

Monotest der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 125631

Cholinesterase:

Testkombination (Substrat: Acetylthiocholin) der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124117

α -Amylase:

(MERCK)

Merckotest, Fa. MERCK, Darmstadt, Nr. 3301

α -Amylase:

(Phadebas)

Phadebas α -Amylase-Test der Fa. PHARMACIA

Lipidbestimmungen

Cholesterin:

Testkombination (Enzymatischer Farbstest) der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124087

Triglyceride:

Testkombination der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, Nr. 124032

Untersuchungsmaterial

Das klare und das trübe Serum mit z.T. erheblich erhöhten Enzymaktivitäten wurde nach Punktion der Cubitalvene von einem unausgewählten Krankengut der Medizinischen Hochschule Hannover gewonnen.

Ergebnisse

In einer ersten Testserie wurde der Einfluß der Heparin- $MgCl_2$ -Lösung auf die Enzymbestimmung im klaren Serum untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a dargestellt und zeigen, daß die Enzymbestimmungen von Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Creatinkinase, Lactatdehydrogenase, α -Hydroxybutyratdehydrogenase, alkalischer Phosphatase, Leucinarylamidase, γ -Glutamyltransferase, Cholinesterase und α -Amylase (MERCK) durch Heparin und $MgCl_2$ unbeeinflusst bleiben.

Inkonstante Restaktivitäten zeigen sich bei der Glutamatdehydrogenase, der α -Amylase (Phadebas) und der sauren Phosphatase. Der Cholesterin- und Triglyceridgehalt änderte sich nach Zusatz von Heparin und $MgCl_2$ nicht.

In der zweiten Testserie wurden die Enzyme, die in der ersten Testserie unbeeinflusst geblieben waren, in lipämischen, trüben Seren vor und nach Präzipitation auf Aktivitätsänderungen überprüft (Tab. 1b). Bei allen Enzymen bis auf die γ -Glutamyltransferase waren im t-Test für gebundene Stichproben vor und nach Präzi-

Tab. 1. Katalytische Konzentrationen der untersuchten Enzyme und Lipidgehalt

a) in klaren Seren vor und nach Heparin-MgCl₂-Präzipitation.b) in lipämischen Seren vor und nach Heparin-MgCl₂-Präzipitation.

N = Anzahl der untersuchten Seren

 \bar{x} = Mittelwerte der Enzymaktivitäten in U/l vor Heparin-MgCl₂-Präzipitation \bar{y} = Mittelwerte der Enzymaktivitäten in U/l nach Heparin-MgCl₂-Präzipitation

d = Differenz der Mittelwerte

S = Signifikanz im t-Test für gebundene Stichproben. n.s. = nicht signifikant

Bereich: Seren mit der niedrigsten bzw. höchsten katalytischen Konzentration

Tab. 1a

	N	Bereich [U/l]	\bar{x} [U/l]	\bar{y} [U/l]	d [U/l]	S
Aspartataminotransferase	10	7– 273	52	54	2	n.s.
Alaninaminotransferase	10	7– 490	105	103	2	n.s.
Glutamatdehydrogenase	14	1– 113	21	11	10	P < 0.02
Creatinkinase	10	4– 176	51	48	3	n.s.
Lactatdehydrogenase	10	105– 304	198	185	13	n.s.
α -Hydroxybutyratdehydrogenase	10	55– 117	91	90	1	n.s.
Saure Phosphatase	6	2– 4	3	2	1	P < 0.001
Alkalische Phosphatase	10	92–1529	319	328	9	n.s.
Leucinarylamidase	16	11– 151	50	46	4	n.s.
γ -Glutamyltransferase	10	9– 500	179	169	10	n.s.
Cholinesterase	10	1067–3537	2325	2383	58	n.s.
α -Amylase (MERCK)	16	93– 316	176	170	6	n.s.
α -Amylase (Phadebas)	7	165– 335	231	39	192	P < 0.001
		[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	
Cholesterin	10	4– 8	5	5	0	n.s.
Triglyceride	8	1– 2	1	1	0	n.s.

Tab. 1b.

	N	Bereich [U/l]	\bar{x} [U/l]	\bar{y} [U/l]	d [U/l]	S
Aspartataminotransferase	10	7– 45	20	21	1	n.s.
Alaninaminotransferase	6	8– 25	14	15	1	n.s.
Creatinkinase	13	6– 121	27	27	0	n.s.
Lactatdehydrogenase	22	79– 275	148	146	2	n.s.
α -Hydroxybutyratdehydrogenase	22	46– 136	90	84	6	n.s.
Alkalische Phosphatase	23	68–2460	500	484	16	n.s.
Leucinarylamidase	19	14– 276	53	54	1	n.s.
γ -Glutamyltransferase	22	3–1450	424	309	115	P < 0.01
Cholinesterase	23	774–5428	2358	2324	34	n.s.
α -Amylase (MERCK)	12	123– 483	243	253	10	n.s.
		[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	
Cholesterin	19	1– 19	11	4	7	P < 0.001
Triglyceride	21	2– 13	6	3	3	P < 0.001

pitiation keine signifikanten Unterschiede der Enzymaktivitäten erkennbar. Der Verdünnungsfaktor von 1 : 10 bei den klaren und lipämischen Seren ist bei der Berechnung berücksichtigt worden. Die Aktivität der γ -Glutamyltransferase war jedoch im trüben lipämischen Serum im Mittel um 37,2% höher als im geklärten Serum.

In 11 weiteren Seren wurde anschließend die γ -Glutamyltransferase-Aktivität im lipämischen Serum, im geklärten Serum und im lipidreichen Überstand nach Präzipitation bestimmt. Die katalytische Konzentration von γ -Glutamyltransferase im lipämischen Serum betrug in diesen 11 Seren im Durchschnitt 931 U/l,

im geklärten Serum 691 U/l und im lipidreichen präzipitierten Überstand 1568 U/l. Die Unterschiede (Tab. 2) waren im t-Test für gebundene Stichproben hochsignifikant (P < 0,001).

Diskussion

Die Ergebnisse unserer ersten Versuchsreihe mit klaren Seren zeigen, daß Heparin und MgCl₂ in der angegebenen Konzentration die Enzymbestimmung von Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Creatinkinase, Lactatdehydrogenase, α -Hydroxybutyratdehydrogenase, alkalischer Phosphatase, Lactatdehydrogenase, γ -Glut-

Tab. 2. Vergleich der katalytischen Konzentration von γ -Glutamyltransferase im trüben Serum (\bar{x}), geklärten Serum (\bar{y}) und lipidreichen Überstand (\bar{z}).

N = Anzahl der untersuchten Seren

Bereich: Seren mit der niedrigsten bzw. höchsten katalytischen Konzentration

S = Signifikanz im t-Test für gebundene Stichproben

Die Unterschiede der γ -Glutamyltransferase-Aktivität sind hochsignifikant

	N	Bereich [U/l]	\bar{x} [U/l]	\bar{y} [U/l]	\bar{z} [U/l]	S_{xy}	S_{xz}
γ -Glutamyltransferase	11	199–1630	931	691	1568	$P < 0.001$	$P < 0.001$

amyltransferase, Cholinesterase und α -Amylase im Merckotest nicht stören. Bei der Glutamatdehydrogenase, der α -Amylase im Phadebas-Test und bei der sauren Phosphatase können nach Heparin- und $MgCl_2$ -Zusatz nur noch Restaktivitäten gemessen werden.

Der Mechanismus der Glutamatdehydrogenase-Hemmung durch Heparin ist seit den Arbeiten von *Horn & Bruns* (4) bekannt und findet hier nur eine Bestätigung. Auch bei der sauren Phosphatase und der α -Amylase im Phadebastest ist die Aktivitätshemmung durch Heparin und $MgCl_2$ schon von *Lambrecht & Seidel* (1) beschrieben und z.T. erklärt worden.

Die Polyanionenpräzipitation mit Heparin und $MgCl_2$ ist somit nicht geeignet zur Klärung von Seren, in denen Glutamatdehydrogenase, saure Phosphatase und α -Amylase im Phadebastest bestimmt werden sollen. Da die Heparin- $MgCl_2$ -Lösung nicht zu einer Inhibition der α -Amylase führt – siehe Ergebnisse im Merckotest – dürfte es im Phadebastest am ehesten zu einer Beeinflussung aller freigesetzten Chromophore durch die Heparin- $MgCl_2$ -Lösung kommen.

Die Cholesterin- und Tryglyceridkonzentration wird bei klaren Seren durch die Polyanionenpräzipitation nicht verändert.

In der zweiten Versuchsreihe mit lipämischen Seren war bei allen gemessenen Enzymen bis auf die γ -Glutamyltransferase im t-Test für gebundene Stichproben vor und nach Präzipitation kein signifikanter Unterschied der Enzymaktivitäten erkennbar.

Die Aktivität der γ -Glutamyltransferase war jedoch im trüben, lipämischen Serum im Mittel um 37% höher als im geklärten Serum. Die Ursache für die erniedrigte γ -Glutamyltransferase-Aktivität im geklärten Serum ist darin begründet, daß die γ -Glutamyltransferase sich mit den Fettpartikeln bei der Präzipitation im lipidreichen Überstand anreichert.

Zusammenfassend ergeben unsere Versuche, daß nach einer Polyanionenpräzipitation mit Heparin und $MgCl_2$ im geklärten Serum von den im Medizinischen Labor häufig bestimmten Enzymen nur folgende Enzymaktivitäten unbeeinflusst sind:

Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase, Creatinkinase, Lactatdehydrogenase, α -Hydroxybutyratdehydrogenase, alkalische Phosphatase, Leucinarylamidase, Cholinesterase und die α -Amylase im Merckotest.

Die Bestimmung der γ -Glutamyltransferase-Aktivität muß im Nativ-Serum erfolgen.

Literatur

1. Lambrecht, J. & Seidel, D. (1974), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 12, 154–158.
2. Freise, J., Magerstedt, P. & Schmidt, E. (1976), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 589–594.
3. Freise, J., Magerstedt, P. & Schmidt, E. (1976), Clin. Chim. Acta 73, 267–275.
4. Horn, H. D. & Bruns, F. H. (1958), Biochem. Z. 331, 58–64.

Dr. med. Jürgen Freise
Medizinische Hochschule Hannover
Abteilung für Gastroenterologie
und Hepatologie
Karl-Wiechert-Allee 9
3000 Hannover 61